

CERTIFIED COPY OF
PRIORITY DOCUMENT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2000-0080608
Application Number

출원 년 월 일 : 2000년 12월 22일
Date of Application DEC 22, 2000

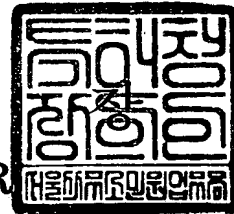
출원 인 : 변유량
Applicant(s) PYUN, Yu Ryang



2005 년 05 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2000.12.22
【발명의 명칭】 호열성 아라비노스 이성화효소 및 그를 이용한 타가토스의 제조방법
【발명의 영문명칭】 Thermostable L-Arabinose Isomerase and Process for Preparing D-tagatose thereby
【출원인】
【성명】 변유량
【출원인코드】 4-1998-010157-5
【대리인】
【성명】 이한영
【대리인코드】 9-1998-000375-1
【포괄위임등록번호】 1999-018552-1
【발명자】
【성명】 변유량
【출원인코드】 4-1998-010157-5
【발명자】
【성명의 국문표기】 김병찬
【성명의 영문표기】 KIM,Byoung Chan
【주민등록번호】 710409-1002311
【우편번호】 411-313
【주소】 경기도 고양시 일산구 일산3동 후곡마을 1007-1201
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이한승

【성명의 영문표기】 LEE, Han Seung
【주민등록번호】 691008-1029310
【우편번호】 142-101
【주소】 서울특별시 강북구 미아1동 791-2137
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이동우
【성명의 영문표기】 LEE, Dong Woo
【주민등록번호】 740202-1231755
【우편번호】 120-103
【주소】 서울특별시 서대문구 홍은3동 294-1
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이윤희
【성명의 영문표기】 LEE, Yoon Hee
【주민등록번호】 761114-2023513
【우편번호】 137-064
【주소】 서울특별시 서초구 방배4동 882-24
【국적】 KR
【미생물기탁】
【기탁기관명】 한국미생물보존센터(KCCM)
【수탁번호】 KCCM-10231
【수탁일자】 2000.12.04
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 4
【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대 리인 영 (인) 이한		
【수수료】			
【기본출원료】	20 면	29,000 원	
【가산출원료】	3 면	3,000 원	
【우선권주장료】	0 건	0 원	
【심사청구료】	0 항	0 원	
【합계】	32,000 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 미생물기탁증명서_1통[(원, 역문)]		

【요약서】

【요약】

본 발명은 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068)로부터 유래된 호열성 아라비노스 이성화효소(L-arabinose isomerase)의 유전자, 전기 유전자를 포함한 재조합 벡터, 전기 벡터로 형질전환된 균주, 전기 균주로부터 제조된 호열성 아라비노스 이성화효소 및 전기 효소를 이용한 타가토스(D-tagatose)의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 재조합 아라비노스 이성화효소는 내열성이 우수하고, 고온에서 높은 수율로 타가토스를 제조할 수 있으므로, 제약 및 식품산업에서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

【대표도】

도 1

【색인어】

타가토스, 아라비노스 이성화효소, 서모토가 네아폴리타나 5068

【명세서】

【발명의 명칭】

호열성 아라비노스 이성화효소 및 그를 이용한 타가토스의 제조방법{Thermostable L-Arabinose Isomerase and Process for Preparing D-tagatose thereby}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명의 아라비노스 이성화효소 유전자를 포함하는 발현벡터의 제조방법을 나타내는 개략도이다.
- <2> 도 2은 본 발명의 아라비노스 이성화효소의 온도에 따른 반응활성을 나타낸 그래프이다.
- <3> 도 3은 본 발명의 아라비노스 이성화효소의 내열성을 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <4> 본 발명은 호열성 아라비노스 이성화효소 및 그를 이용한 타가토스의 제조방법에 관한 것이다. 좀 더 구체적으로, 본 발명은 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068)로부터 유래된 호열성 아라비노스 이성화효소(L-arabinose isomerase)의 유전자, 전기 유전자를 포함한 재조합 벡터, 전기 벡터

로 형질전환된 균주, 전기 균주로부터 제조된 호열성 아라비노스 이성화효소 및 전기 효소를 이용한 타가토스(D-tagatose)의 제조방법에 관한 것이다.

<5> 근래에 와서 건강에 대한 관심이 높아지면서, 식품에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 전기 연구의 결과, 과량 섭취하면 각종 성인병을 유발시킬 수도 있는 설탕의 역할을 대체할 수 있는 감미료로서 개발된 당알코올류가 실질적으로 사용되고 있다. 그러나, 전기 당알코올류는 일정량 이상 섭취시 설사를 유발하는 부작용이 있는 것으로 알려져, 부작용이 없는 대체감미료의 개발이 절실히 요구되고 있다.

<6> 비교적 부작용이 없는 대체감미료로서 개발된 물질 중, 타가토스는 갈락토스의 케톤당(keto sugar)으로서, 과당(D-fructose)과 같은 수준의 감미도를 갖지만, 체내에 흡수가 되지 않고, 대사가 일어나지 않으므로, 부작용이 없는 저칼로리 설탕대체 감미료로 사용될 수 있음이 알려져 있다. 또한, 다른 유용한 광학활성 화합물 합성을 위한 중간체나, 세제, 화장품, 약물의 첨가제 및 원료로 사용되어 질 수 있음이 알려져 있는데, 특히 혈중내 포도당 농도를 저하시킬 수 있으며, 인슐린(insulin)을 요구하지 않는 당뇨병 치료제 및 예방제 그리고, 다이어트제로 이용될 수 있음이 밝혀져 있다.

<7> 현재, 타가토스는 주로 갈락토스로부터 화학적 합성방법에 의해 제조되고 있다(참조: USP5,002,612). 전기 제조방법은 무기염의 존재하에서 금속 하이드록사이드(metal hydroxide)가 촉매로 작용하여 갈락토스를 이성화하고, 금속 하이드록사이드-타가토스-복합체 형태의 중간체를 형성한 후, 산으로 중화하여 최종적으로

타가토스를 생산하는 공정을 포함한다.

<8> 또 다른 타가토스의 제조방법으로, 알도스(aldose) 또는 알도스 유도체로부터 케토스(ketose) 또는 케토스의 유도체의 전환에 의하여, 갈락토스를 타가토스로 효율적인 방법에 의하여 전환시키는 방법이 알려져 있다. 특히, 아라비노스(L-arabinose)를 리불로스(L-ribulose)로 전환시키는데 이용되는 아라비노스 이성화효소는 시험관상에서 갈락토스를 기질로 하여 타가토스를 제조할 수 있음이 알려져 있다. 그러나, 아라비노스 이성화효소에 의한 갈락토스로부터 타가토스로의 제조 수율은 20% 정도로 매우 낮기 때문에, 갈락토스로부터 타가토스로의 전환은 현재까지 산업적으로 이용될 수 없었다. 또한, 치즈나 우유로부터 타가토스를 생산하는 방법이 개발되기도 하였으나(참조: USP6,057,135), 역시 낮은 수율로 인하여 산업적으로 이용될 수 없었다.

<9> 따라서, 높은 수율로 타가토스를 제조할 수 있는 효소를 개발하여야 할 필요성이 끊임없이 대두되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<10> 이에, 본 발명자들은 높은 수율로 타가토스를 제조할 수 있는 효소를 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068, DSM 5068)로부터 수득한 아라비노스 이성화효소의 유전자를 클로닝하고, 전기 유전자를 삽입한 재조합 벡터를 대장균에 형질전환시켜 생산한 재조합 아라비노

스 이성화효소를 사용할 경우, 갈락토스로부터 높은 수율로 타가토스를 제조할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

<11> 결국, 본 발명의 첫 번째 목적은 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068)로부터 유래된 아라비노스 이성화효소의 유전자를 제공하는 것이다.

<12> 본 발명의 두 번째 목적은 전기 유전자에 의하여 발현된 아라비노스 이성화효소를 제공하는 것이다.

<13> 본 발명의 세 번째 목적은 전기 아라비노스 이성화효소의 유전자를 포함하는 재조합 벡터를 제공하는 것이다.

<14> 본 발명의 네 번째 목적은 전기 벡터로 형질전환된 재조합 대장균을 제공하는 것이다.

<15> 본 발명의 다섯 번째 목적은 전기 효소를 이용하여 갈락토스로부터 타가토스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<16> 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다.

<17> 본 발명자들은 산업적으로 유용한 호열성 또는 내열성 아라비노스 이성화효

소를 제조하기 위하여, 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068, DSM 5068)의 전체 유전자(genomic DNA)로부터 아라비노스 이성화효소를 암호화하는 유전자를 클로닝하고, 전기 유전자의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 본 발명의 아라비노스 이성화효소를 암호화하는 유전자는 게놈프로젝트에 의해 그 유전자 염기 서열이 모두 밝혀진 서모토가 마리티마(*Thermotoga maritima*)의 아라비노스 이성화효소일 것으로 추정되고 있는 유전자의 염기서열과 83.2%의 상동성을 지님을 확인하였다.

<18> 전기 클로닝된 아라비노스 이성화효소를 대장균에서 대량으로 발현시키기 위하여, 발현벡터 pET22b(+)(Novagen, U.S.A.)에 전기 효소의 유전자를 삽입시켜 재조합 발현벡터 pTNAI를 제조하고, 전기 재조합 발현벡터 pTNAI로 대장균 BL21(*E. coli* BL21)을 형질전환시켜 재조합 균주를 수득한 후, 대장균 BL21/DE3(*E. coli* BL21/DE3)라 명명하였으며, 그를 2000년 12월 4일자로 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms, KCCM)에 기탁번호 KCCM-10231로 기탁하였다.

<19> 전기 대장균 BL21/pTNAI를 배양하고, 이로부터 생산되는 재조합 아라비노스 이성화효소의 활성을 조사한 결과, 반응최적 pH가 5 내지 8이고, 반응 최적온도가 90℃ 부근이며, 70℃에서 2시간 열처리한 후의 잔존효소활성이 80% 이상으로 열에 매우 안정함을 확인하였다.

<20> 또한, 본 발명의 재조합 아라비노스 이성화효소를 이용하여 갈락토스의 수용

액을 이성화 반응시킨 결과, 40 내지 50%의 전환수율로 타가토스를 생산함을 확인하였다.

<21> 전기 재조합 아라비노스 이성화효소를 사용하여 산업적으로 타가토스를 생산할 경우, 재조합 아라비노스 이성화효소를 반응용액에 용해시킨 상태로 이용할 수도 있으나, 산업적으로 이용가능한 비드에 고정화시킨 상태로 사용함이 바람직하다.

<22> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<23> 실시예 1: 아라비노스 이성화효소 유전자의 클로닝

<24> 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068, DSM 5068)을 혐기적으로 배양하고, 원심분리($8000 \times g$, 10분)하여 균체를 수득하였다. 전기 수득된 균체로부터 유전자를 분리하고, 제한효소 *Sau*3AI(Takara Biotechnology, Japan)으로 부분절단하여 12kb 이하의 유전자단편을 수득하였다. 전기 유전자 단편을 잭발현벡터(ZAP Express Vector, Stratagene, U.S.A.)에 삽입시키고, 패키징

(packaging)하여 서모토가 네아폴리타나 5068의 유전자 라이브러리(genomic DNA library)를 제조하였다. 종래의 호열성 또는 내열성 아라비노스 이성화효소를 암호화하는 유전자의 염기서열을 분석하여, 프라이머 araAF: 5'-

ATGATAGATCTCAAGCAGTAC-3'(서열번호 1)과 프라이머 araAR: 5'-TCATCTTTTC-AAAAGCCCCC-3'(서열번호 2)를 제작하고, 전기 프라이머를 이용하여 상기에서 수득한 서모토가 네아폴리타나 5068의 전체 유전자로부터 PCR을 이용하여 DNA-DNA 혼성화반응(hybridization)에 사용할 탐침(probe)을 제조하였다. DNA-DNA 혼성화반응을 통하여 전기 유전자 라이브러리로부터 아라비노스 이성화효소를 포함하는 유전자를 선별하여, 서모토가 네아폴리타나 5068의 아라비노스 이성화효소를 암호화하는 유전자를 포함하는 벡터를 제작하였다. 전기에서 클로닝한 아라비노스 이성화효소 유전자의 염기서열(서열번호 3) 및 전기 유전자로부터 유추되는 아미노산 서열(서열번호 4)을 종래의 공지된 아라비노스 이성화효소 유전자의 염기서열 및 아미노산서열과 비교하였다(참조: 표 1)

【표 1】

아라비노스 이성화효소간의 상동성 비교

균주	유전자 서열 (상동성, %)	아미노산 서열 (상동성, %)
서모토가 마리티마 (<i>Thermotoga maritima</i>)	83.2	94.8
바실러스 스테아로써모필러스 (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	61.9	62.8
바실러스 할로두란스 (<i>Bacillus halodurans</i>)	59.1	59.0

바실러스 서브틸리스 (<i>Bacillus subtilis</i>)	58.6	55.5
살모넬라 티피무리움 (<i>Salmonella typhimurium</i>)	57.8	54.5
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	59.0	54.3
마이코박테리움 스메그마티스 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)	56.3	50.7

<26> 상기 표 1에서 보듯이, 본 발명의 아라비노스 이성화효소는 종래의 서모토가 마리티마의 아라비노스 이성화효소로 추정되는 유전자와 유전자상으로 83.2%, 아미노산 상으로 94.8%의 상동성을 나타내었다.

<27> 실시예 2: 재조합 발현벡터 및 재조합 균주의 제조

<28> 실시예 1의 아라비노스 이성화효소를 암호화하는 유전자를 이용하여, 전기호열성 아라비노스 이성화효소를 대장균에서 대량으로 발현시키기 위하여, *Nde*I과 *Eco*RI으로 절단한 발현벡터 pET 22b(+)(Novagen, U.S.A.)에 전기 효소의 유전자를 삽입시켜 재조합 발현벡터 pTNAI를 제조하고(참조: 도 1), 전기 재조합 발현벡터 pTNAI로 대장균 BL21(*E. coli* BL21)을 형질전환시켜 재조합 균주를 제조한 후, 대장균 BL21/DE3(*E. coli* BL21/DE3)라 명명하였으며, 그를 2000년 12월 4일자로 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제 1동 361-221번지에 소재하는 국제기탁기관인 한국종균협회 부설 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms,

KCCM)에 기탁번호 KCCM-10231로 기탁하였다.

<29> 실시예 3: 재조합 아라비노스 이성화효소의 발현

<30> 상기 실시예 2에서 제조된 재조합 균주 대장균 BL21/DE3을 LB(Luria-Bertani) 배지에 1%(v/v) 접종하고, 37℃에서 2시간 동안 배양한 다음, 최종 농도가 1mM이 되도록 락토오스를 첨가하여, 12시간 동안 재조합 아라비노스 이성화효소의 발현을 유도하였다. 발현된 아라비노스 이성화효소의 활성을 측정하기 위하여, 배양액을 원심분리(8000 ×g, 10분)하여 균체만을 모으고, 100mM MOPS 완충용액(4-morpholinepropanesulfonic acid, pH 7.0) 10ml에 다시 현탁시킨 후, 초음파처리(sonication)하여 세포를 완전히 파쇄한 다음, 이를 조효소액으로 사용하여 아라비노스 이성화반응을 실시하였다. 아라비노스 이성화반응은 전기 조효소액 100μl와 기질로 10mM 갈락토스를 혼합하고, 조인자(최종농도 5mM MgSO₄, 5mM MnCl₂, 0.5mM CoCl₂)를 포함하는 1ml의 효소반응액(100mM MOPS 완충용액, pH 7.0)을 80℃에서 30분간 반응시켜서 수행하였다. 생성된 산물은 시스테인-카바졸-황산(cysteine-carbazole-sulfuric acid)법을 사용하여 검출하였다(참조: Dische, Z., and E. Borenfreund., A New Spectrophotometric Method for the Detection and Determination of Keto Sugars and Trioses, *J. Biol. Chem.*, 192:583-587, 1951). 그 결과, 정상적인 아라비노스 이성화반응이 수행됨을 알 수 있었다.

<31> 실시예 4: 재조합 아라비노스 이성화효소의 순수분리

<32> 상기 실시예 2의 방법으로 발현시킨 재조합 아라비노스 이성화효소를 정제하기 위하여, 재조합균주 배양액을 원심분리($8000 \times g$, 19분)하여 균주만을 모은 다음, 초음파처리하여 대장균의 세포벽을 파괴하고, $20,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 침전물(균체)을 제거하고 상등액을 수득하였다. 이어, 전기 상등액을 90°C 에서 60분간 열처리하고, $20,000 \times g$ 에서 20분간 원심분리하여 침전물을 제거한 후, 상등액을 수득한 다음, 암모늄설페이트 침전법을 이용하여 잔존 오염단백질을 제거하고, 최종적으로 이온교환컬럼(Q-Sepharose Fast Flow, Pharmacia, Sweden)을 이용한 컬럼크로마토그래피를 수행하여, 재조합 아라비노스 이성화효소를 순수분리하였다. pH에 따른 전기 순수분리된 효소의 활성을 조사한 결과, 최적 pH는 5 내지 8임을 알 수 있었다.

<33> 실시예 5: 재조합 아라비노스 이성화효소의 반응최적온도

<34> 전기 실시예 4에서 순수분리된 재조합 아라비노스 이성화효소의 반응최적온도를 구하기 위하여, 상기 실시예 3에서와 동일한 방법을 이용하여, 반응온도에 따른 효소의 반응활성을 측정하였다. 이때, 반응온도는 50, 60, 70, 80, 90 및 100

℃이고, 각각의 온도에서 아라비노스 이성화효소활성을 측정한 결과, 90℃ 부근에서 최대활성을 나타냄을 알 수 있었다(참조: 도 2).

<35> 실시예 6: 재조합 아라비노스 이성화효소의 내열성 조사

<36> 본 발명의 재조합 아라비노스 이성화효소의 열에 대한 안정성을 알아보기 위하여, 상기 실시예 3의 조효소액을 90℃에서 10, 30, 60, 90 및 120분 동안 열처리하고, 이를 포함하는 효소반응액 1ml를 이성화반응시켜, 재조합 아라비노스 이성화효소의 잔존활성을 실시예 3에서와 동일한 방법을 이용하여, 측정하였다(참조: 도 3). 도 3에서 보듯이, 90℃에서 2시간 열처리하였을 경우, 80%이상의 잔존활성이 남아있음을 알 수 있었다.

<37> 실시예 7: 온도에 따른 타가토스의 제조수율

<38> 본 발명의 재조합 아라비노스 이성화효소를 이용하여 갈락토스로부터 타가토스를 제조할 때, 온도에 따른 제조수율을 측정하였다. 상기 실시예 3의 효소반응액 1ml를 60, 70, 80 및 90℃에서 120분 동안 반응시키고, 제조된 타가토스의 수율을 BioLC를 이용하여 분석하였다(참조: 표 2).

【표 2】

<39>

온도에 따른 타가토스로의 제조수율

효소반응온도	60℃	70℃	80℃	90℃
타가토스 생산수율(%)	44.7	46.5	48.3	49.7

<40>

상기 표 2에서 보듯이, 반응온도가 증가할수록 타가토스로의 제조수율이 증가하고, 40 내지 50%의 높은 제조수율로 타가토스를 제조할 수 있음을 확인하였다.

【발명의 효과】

<41>

이상에서 상세히 설명하고 입증하였듯이, 본 발명은 서모토가 네아폴리타나 5068(*Thermotoga neapolitana* 5068)로부터 유래된 호열성 아라비노스 이성화효소(L-arabinose isomerase)의 유전자, 전기 유전자를 포함한 재조합 벡터, 전기 벡터로 형질전환된 균주, 전기 균주로부터 제조된 호열성 아라비노스 이성화효소 및 전기 효소를 이용한 타가토스(D-tagatose)의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 아라비노스 이성화효소는 내열성이 우수하고, 고온에서 높은 수율로 타가토스를 제조할 수 있으므로, 제약 및 식품산업에서 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

서머토가 속(*Thermotoga* sp.)의 균주에서 유래한 아라비노스 이성화효소 유전자.

【청구항 2】

서열번호 3의 염기서열을 가지는 재조합 아라비노스 이성화효소의 유전자.

【청구항 3】

제 2항의 염기서열로부터 유추되는, 서열번호 4의 아미노산 서열을 가지는 재조합 아라비노스 이성화효소.

【청구항 4】

서머토가 속(*Thermotoga* sp.)의 균주에서 유래한 아라비노스 이성화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터.

【청구항 5】

서열번호 3의 재조합 아라비노스 이성화효소 유전자를 포함하며, 도 1에 개

시되어 있는 유전자 지도를 갖는 재조합 발현벡터 pTNAI.

【청구항 6】

서머토가 속(*Thermotoga* sp.)의 균주에서 유래한 아라비노스 이성화효소 유전자를 포함하는 재조합 발현벡터로 형질전환된 균주.

【청구항 7】

제 5항의 재조합 발현벡터 pTNAI로 형질전환된 대장균 BL21/DE3(*E. coli* BL21/DE3)(KCCM-10231).

【청구항 8】

제 7항의 대장균 BL21/DE3(KCCM-10231)을 배양하여 재조합 아라비노스 이성화효소를 수득하는 공정을 포함하는 재조합 아라비노스 이성화효소의 제조방법.

【청구항 9】

제 3항의 재조합 아라비노스 이성화효소를 이용하여, pH 5 내지 8, 50 내지 100℃의 온도에서 갈락토스를 기질로하여 타가토스를 제조하는 공정을 포함하는 타가토스의 제조방법.

【청구항 10】

제 9항에 있어서,

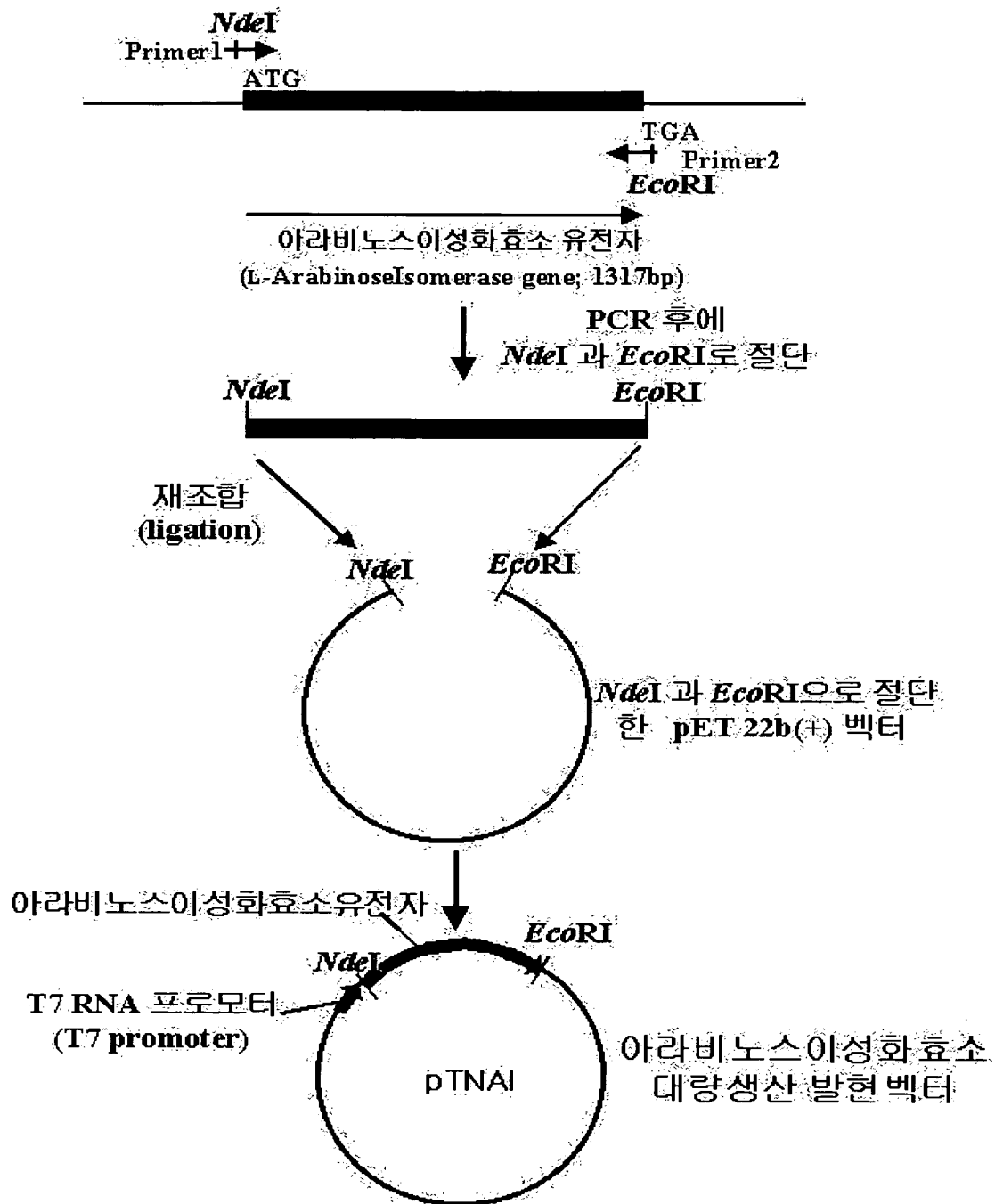
고정화된 재조합 아라비노스 이성화효소를 사용하는 것을 특징으로

하는

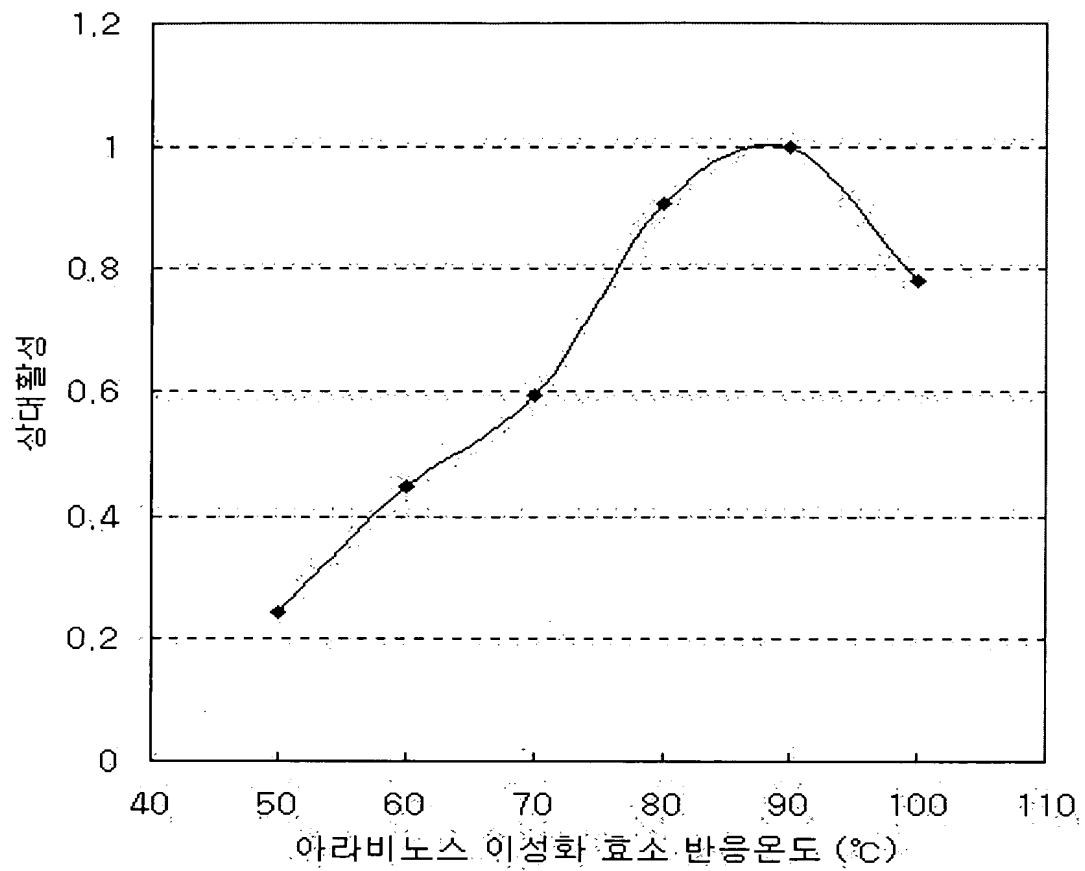
타가토스의 제조방법.

【도면】

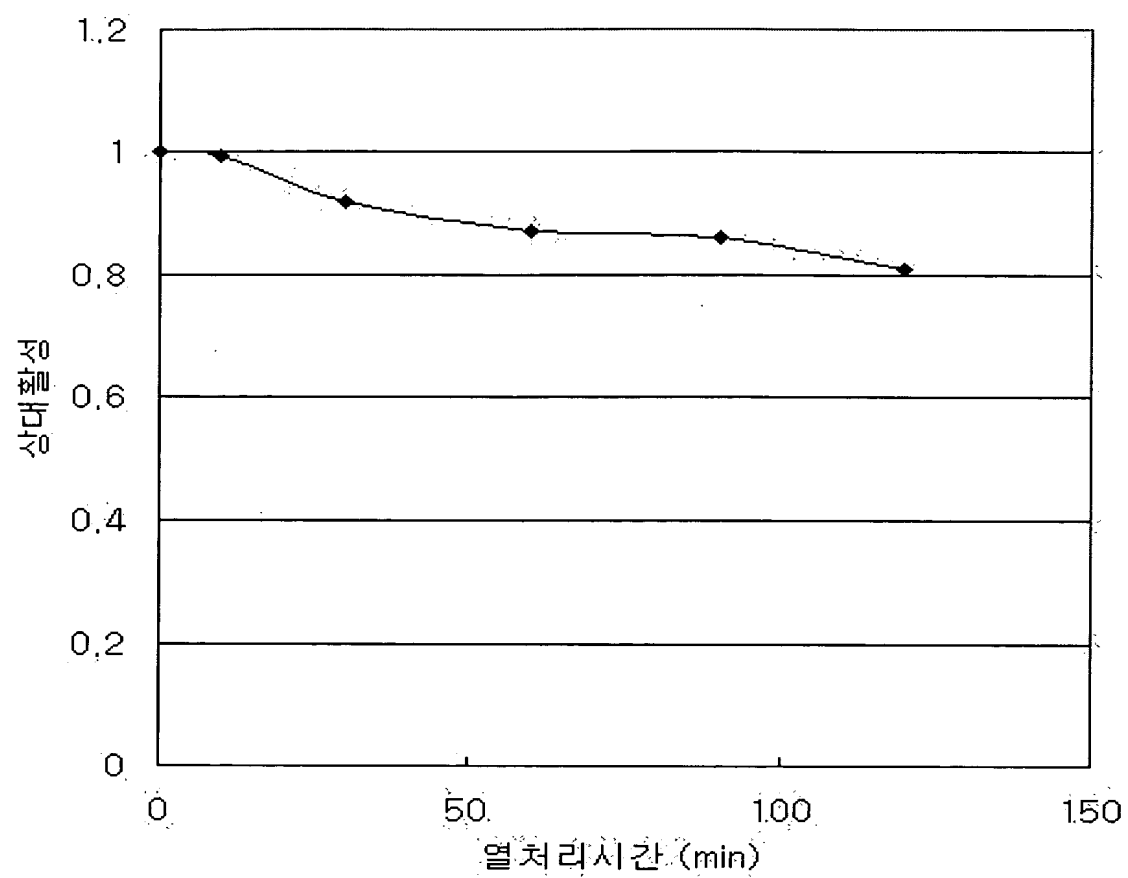
【도 1】



【도 2】



【도 3】



【서열목록】

<110> PYUN, YU RYANG

<120> Thermostable L-Arabinose Isomerase and Process for Preparing D-tagatose thereby

<130> DP01202
 <160> 4
 <170> KopatentIn 1.6
 <210> 1
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer araAF
 <400> 1
 atgatagatc tcaagcagta c 21
 <210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> primer araAR
 <400> 2
 tcattcttttc aaaagccccc 20
 <210> 3
 <211> 1491
 <212> DNA
 <213> Thermotoga neapolitana 5068
 <400> 3
 atgatagatc tcaagcagta cgagttctgg tttcttctcg gcagccagta tctctacggt 60
 ctggagacgt tgaagaaggt agagcagcag gcaagcagga tagttgaggc actgaacaat 120
 gatcccatTT ttccttcaaa gatcgttctg aaacctgttc tgaaaaattc cgccgagatc 180
 agagagatct tcgaaaaggc aaatgcagaa ccaaaatgcg ccggtgtcat cgtgtggatg 240
 cacacgttct caccttcgaa gatgtggata agaggcctct ccatcaataa aaaaccctg 300
 cttcacctcc acaccagta caacaggag atccccgtggg acacgatcga tatggactac 360
 atgaacctga accaatctgc ccacggtgac agggaacacg gattcattca cgcgaggatg 420
 agactcccaa gaaaggctgt ggtgggacat tgggaagaca gagaagtcag ggaaaagatc 480
 gcaaaatgga tgagagtggc ctgcgcgata caggatggaa gaactggaca gatcgtgaga 540
 ttcggcgata acatgagaga ggttgccagc accgaagacg acaagggtgga ggcacagata 600
 aaactcggct ggtccataaa cacctggggt gtcggagagc tcgccgaggg agtgaaggcg 660
 gttccagaaa acgaagtgga ggaattgttg aaggagtaca aagaaaggta catcatgcca 720
 gaagacgaat acagcctcaa agcgatcaga gaacaggcga agatggagat tgcactgaga 780


```

gagtttctga aagagaagaa tgccatcgcc ttcaccacca ctttcgagga tcttcacgat      840
cttccccagc ttcccggtct tgcagtcagc aggcctcatgg aggaagggtg tggatttgga      900
gcggaaggag actggaaggc agccgggctt gtgagggtctt tgaaggtcat gggagctggt      960
cttcccggtg glacatcctt catggaggac tacacctacc atctcacacc gggaaacgaa     1020
ctcgtgctgg gagcgccatc gctagagggtg tgccccacga tcgctaagga aaagccaaga     1080
atagagggtc atcctctcag catcggtgga aaagcagatc ctgcacgcct tgttttcgat     1140
ggacaagaag gtcccgtgtt caacgcctcc atcggtgaca tgggaaacag gttcaggctg     1200
gtagtgaaca gagtgtgtgc tgttccattt gaaaggaaga tgcccaaact tccaacggca     1260
agagttttgt ggaagccgct tcctgatttc aagagggtcga cgactgcgtg gattctcgtt     1320
ggaggatccc atcatactgc cttctcaaca gcggtggatg tggagtacct catcgactgg     1380
gcggaggctt tggagataga gtatcttctc atcgatgaaa atctggatct ggagaacttc     1440
aaaaaggaac tgagatggaa cgaactctac tgggggcttt tgaaaagatg a              1491

```

<210> 4

<211> 496

<212> PRT

<213> Thermotoga neapolitana 5068

<400> 4

```

Met Ile Asp Leu Lys Gln Tyr Glu Phe Trp Phe Leu Val Gly Ser Gln
  1             5             10             15
Tyr Leu Tyr Gly Leu Glu Thr Leu Lys Lys Val Glu Gln Gln Ala Ser
      20             25             30
Arg Ile Val Glu Ala Leu Asn Asn Asp Pro Ile Phe Pro Ser Lys Ile
      35             40             45
Val Leu Lys Pro Val Leu Lys Asn Ser Ala Glu Ile Arg Glu Ile Phe
      50             55             60
Glu Lys Ala Asn Ala Glu Pro Lys Cys Ala Gly Val Ile Val Trp Met
      65             70             75             80
His Thr Phe Ser Pro Ser Lys Met Trp Ile Arg Gly Leu Ser Ile Asn
      85             90             95
Lys Lys Pro Leu Leu His Leu His Thr Gln Tyr Asn Arg Glu Ile Pro
      100            105            110
Trp Asp Thr Ile Asp Met Asp Tyr Met Asn Leu Asn Gln Ser Ala His
      115            120            125
Gly Asp Arg Glu His Gly Phe Ile His Ala Arg Met Arg Leu Pro Arg
      130            135            140
Lys Val Val Val Gly His Trp Glu Asp Arg Glu Val Arg Glu Lys Ile
      145            150            155            160

```

Ala Lys Trp Met Arg Val Ala Cys Ala Ile Gln Asp Gly Arg Thr Gly
 165 170 175
 Gln Ile Val Arg Phe Gly Asp Asn Met Arg Glu Val Ala Ser Thr Glu
 180 185 190
 Asp Asp Lys Val Glu Ala Gln Ile Lys Leu Gly Trp Ser Ile Asn Thr
 195 200 205
 Trp Gly Val Gly Glu Leu Ala Glu Gly Val Lys Ala Val Pro Glu Asn
 210 215 220
 Glu Val Glu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Lys Glu Arg Tyr Ile Met Pro
 225 230 235 240
 Glu Asp Glu Tyr Ser Leu Lys Ala Ile Arg Glu Gln Ala Lys Met Glu
 245 250 255
 Ile Ala Leu Arg Glu Phe Leu Lys Glu Lys Asn Ala Ile Ala Phe Thr
 260 265 270
 Thr Thr Phe Glu Asp Leu His Asp Leu Pro Gln Leu Pro Gly Leu Ala
 275 280 285
 Val Gln Arg Leu Met Glu Glu Gly Tyr Gly Phe Gly Ala Glu Gly Asp
 290 295 300
 Trp Lys Ala Ala Gly Leu Val Arg Ala Leu Lys Val Met Gly Ala Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Gly Gly Thr Ser Phe Met Glu Asp Tyr Thr Tyr His Leu Thr
 325 330 335
 Pro Gly Asn Glu Leu Val Leu Gly Ala His Met Leu Glu Val Cys Pro
 340 345 350
 Thr Ile Ala Lys Glu Lys Pro Arg Ile Glu Val His Pro Leu Ser Ile
 355 360 365
 Gly Gly Lys Ala Asp Pro Ala Arg Leu Val Phe Asp Gly Gln Glu Gly
 370 375 380
 Pro Ala Val Asn Ala Ser Ile Val Asp Met Gly Asn Arg Phe Arg Leu
 385 390 395 400
 Val Val Asn Arg Val Leu Ser Val Pro Ile Glu Arg Lys Met Pro Lys
 405 410 415
 Leu Pro Thr Ala Arg Val Leu Trp Lys Pro Leu Pro Asp Phe Lys Arg
 420 425 430
 Ala Thr Thr Ala Trp Ile Leu Ala Gly Gly Ser His His Thr Ala Phe
 435 440 445
 Ser Thr Ala Val Asp Val Glu Tyr Leu Ile Asp Trp Ala Glu Ala Leu

450 455 460
Glu Ile Glu Tyr Leu Val Ile Asp Glu Asn Leu Asp Leu Glu Asn Phe
465 470 475 480
Lys Lys Glu Leu Arg Trp Asn Glu Leu Tyr Trp Gly Leu Leu Lys Arg
485 490 495